

LA 1 Screening Reagent

LA 1 **REAGENT**

LA 2 Confirmation Reagent

LA 2 **REAGENT**

Упрощенный тест с разбавленным ядом гадюки Рассела (DRVVT) для обнаружения волчаночных антикоагулянтов

Назначение

Реагент для скрининга LA 1 и реагент для подтверждения LA 2 являются реагентами для проведения упрощенного теста DRVVT для обнаружения волчаночных антикоагулянтов (LA) в одноэтапном анализе свертываемости крови.

Реагент для скрининга LA 1

Реагент для проведения упрощенного теста DRVVT для обнаружения волчаночных антикоагулянтов.

Реагент для подтверждения LA 2

Реагент для проведения DRVVT с высоким содержанием фосфолипидов для уточнения данных о волчаночных антикоагулянтах.

Резюме и разъяснение

Реагенты LA представляют собой аутоиммунные антитела к отрицательно заряженным фосфолипидам или комплексам фосфолипидов и содержат аполипопротеин Н или фактор свертываемости в качестве протромбиновых факторов. Они возникают в различных клинических условиях, в первую очередь при наличии аутоиммунного заболевания¹, в данный момент считаются значимым фактором риска у пациентов с иначе необъяснимыми тромбозами и зачастую присутствуют у женщин с привычным невынашиванием беременности⁵. Реагент LA традиционно обнаруживается с помощью фосфолипид-чувствительных анализов свертываемости крови, таких как активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), каолиновое время свертывания (КВС) и тест DRVVT², где они оказывают антикоагулянтное действие.

Тест на время DRVV впервые стал популярен после публикации Thiagarajan с соавторами в 1986 году⁶. Данный метод был стандартизирован и упрощен⁷. Согласно Petri⁸ с соавторами, тромбоз у пациентов с системной красной волчанкой более тесно связан с LA, обнаруживаемыми с помощью теста DRVVT, чем с антителами к кардиолипину, обнаруживаемыми методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА)⁵. Это наблюдение было недавно расширено Galli и Bevers⁹, которые показали, что подтип LA, показывающий наибольшую эффективность в тесте DRVVT, является аполипопротеин-Н-зависимым и отличается от протромбин-зависимого подтипа LA, показывающего наибольшую эффективность в тесте КВС.

Методика анализа

1. Яд гадюки Рассела, присутствующий в реагенте для скрининга LA 1, запускает сворачивание плазмы крови, непосредственно активируя фактор X. Антитела LA продлевают время свертывания крови реагента для скрининга LA 1.
2. Реагент для подтверждения LA 2 во многом аналогичен реагенту для скрининга LA 1, но содержит высокую концентрацию фосфолипидов. Дополнительные фосфолипиды противодействуют антителам LA и корректируют время свертывания³.
3. Тест DRVV «обходит» фактор VII внешнего пути активации свертывания крови и фактор контакта и антигемофильный фактор внутреннего пути активации. Поэтому реагент для скрининга LA 1 является более специфичным для LA, чем АЧТВ, поскольку он не подвержен влиянию нарушений фактора контакта, дефицита фактора VIII или антител к нему⁶. Было разработано множество тестов, основанных на коррекции эффекта с помощью фосфолипидов⁴, однако ни один из них не был таким удобным, как использование реагента для подтверждения LA 2 после реагента для скрининга LA 1.
4. Может оказаться полезным проведение анализов со смешиванием для исключения дефицита факторов II, V и X, которые могут продлить результаты действия реагента для скрининга LA 1 и реагента для подтверждения LA 2. Смешивание плазмы здоровых лиц с тестовой плазмой восполняет дефицит иных факторов в тестовой плазме. Если анализ со смешиванием по-прежнему проходит долго, значит, в тестовой плазме присутствует ингибитор (например, LA). Наличие циркулирующего ингибитора обычно определяется по увеличению времени свертывания, которое не уменьшается при смешивании плазмы пациентов с нормальной плазмой^{3,10}.

Реагенты

Состав

Реагент для скрининга LA 1 и реагент для подтверждения LA 2 содержат яд гадюки Рассела, фосфолипиды, антигепариновые агенты, кальций, буферные растворы, стабилизаторы, азид натрия и красители.

Предупреждения и меры предосторожности

Только для диагностики *in vitro*.

При утилизации азиды всегда смывайте его с большими объемами воды во избежание формирования взрывоопасного остатка в металлических трубах.

Подготовка к использованию

Восстановите указанным на флаконе объемом дистиллированной воды. Тщательно перемешайте, перевернув, чтобы обеспечить полное суспендирование лиофилизированного материала.

Инструкции по хранению

Лиофилизированные реагенты стабильны по меньшей мере до истечения срока годности, указанного на этикетке флакона, при хранении при 2 до 8 °C.

Следующие восстанавливаемые реагенты можно хранить в течение 8 ч. при 37 °C, 24 ч. при 20 до 25 °C, 48 часов при 2 до 8 °C и 1 мес. при -20 °C.

Признаки нестабильности/ухудшения

При открытии флакона отсутствуют признаки того, что внутри был вакуум и/или реагент не кажется сухим, его следует вернуть в Siemens Healthcare Diagnostics.

Забор образца и обращение с ним

Сбор и обработку крови следует проводить в соответствии со стандартами NCCLS H21-A3: Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Coagulation Testing and General Performance of Coagulation Assays; Approved Guideline — 3^e издание (1998 год). Отделенную плазму следует хранить при 2 до 8 °C и проводить анализ в пределах 4 ч. от собранного.

Если образцы до анализа будут замораживаться, плазму следует дважды центрифугировать перед замораживанием для удаления тромбоцитов (до уровня ниже $10 \times 10^9 / \text{л}$)¹⁰, так как они могут сократить время свертывания реагента для скрининга LA 1.

Процедура

1. Предварительно нагрейте небольшой образец реагента для скрининга LA 1 или реагента для подтверждения LA 2 при температуре $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ в резервуаре для реагента, в количестве 200 мкл на анализ.
2. Отделите 200 мкл тестовой плазмы в стеклянную пробирку и прогрейте в течение 1 мин. при 37 °C .
3. Добавьте в плазму 200 мкл предварительно нагретого реагента и оценивайте время от момента добавления реагента до окончания свертывания.
4. Проведите повторный анализ, запишите полученные данные и примите за результат среднее значение двух наборов данных.

Автоматизированный метод

Протоколы для анализаторов Siemens доступны по запросу.

Анализы с использованием реагента для скрининга LA 1 и реагента для подтверждения LA 2 должны быть проведены с использованием равных объемов тестовой плазмы и реагентов, как и в большинстве протоколов тромбинового времени. Тем не менее, наблюдение или время сбора данных должно быть увеличено до 120 сек.

Предоставленные материалы

LA 1 [REAGENT], [REF] OQGP с

10 x → 2 мл LA 1 [REAGENT], реагентом для скрининга LA 1

LA 2 [REAGENT], [REF] OQGR с

10 x → 1 мл LA 2 [REAGENT], реагентом для подтверждения LA 2

Необходимые материалы, не входящие в комплект поставки

10 мм x 75 мм стеклянных пробирок для анализа

Пипетка для переноса 200 мкл, 1 мл, 2 мл или 5 мл

Водяная баня, секундомер

Вода очищенная, ФССА или эквивалентный материал

Контроль LA высокой концентрации ([REF] OQWD)

Контроль LA низкой концентрации ([REF] OQWE)

Внутренний контроль качества

Каждая лаборатория должна определить свои собственные приемлемые значения контролей и нормального диапазона.

Контроль LA высокой концентрации ([REF] OQWD) и контроль LA низкой концентрации ([REF] OQWE) предоставляются компанией Siemens использования при контроле качества анализов с использованием реагента для скрининга LA 1 и реагента для подтверждения LA 2. Анализ контрольного образца плазмы должен проводиться в то же время, что и анализ образцов пациента.

Результаты

Если время свертывания реагента для скрининга LA 1 находится в пределах нормального диапазона, дальнейшие испытания с использованием LA могут не понадобиться. Если время свертывания реагента для скрининга LA 1 более чем на два средних отклонения больше такового для нормальной плазмы (в идеале $n \geq 20$), результат следует считать аномальным и провести дополнительные исследования. (см. рис. 1)

Окончательный результат лучше всего выражать как отношение диапазона показателей времени свертывания реагента для скрининга LA 1 к времени свертывания реагента для подтверждения LA 2.

$$\text{Соотношение LA} = \frac{\text{время свертывания реагента для скрининга LA 1}}{\text{время свертывания реагента для скрининга LA 2}}$$

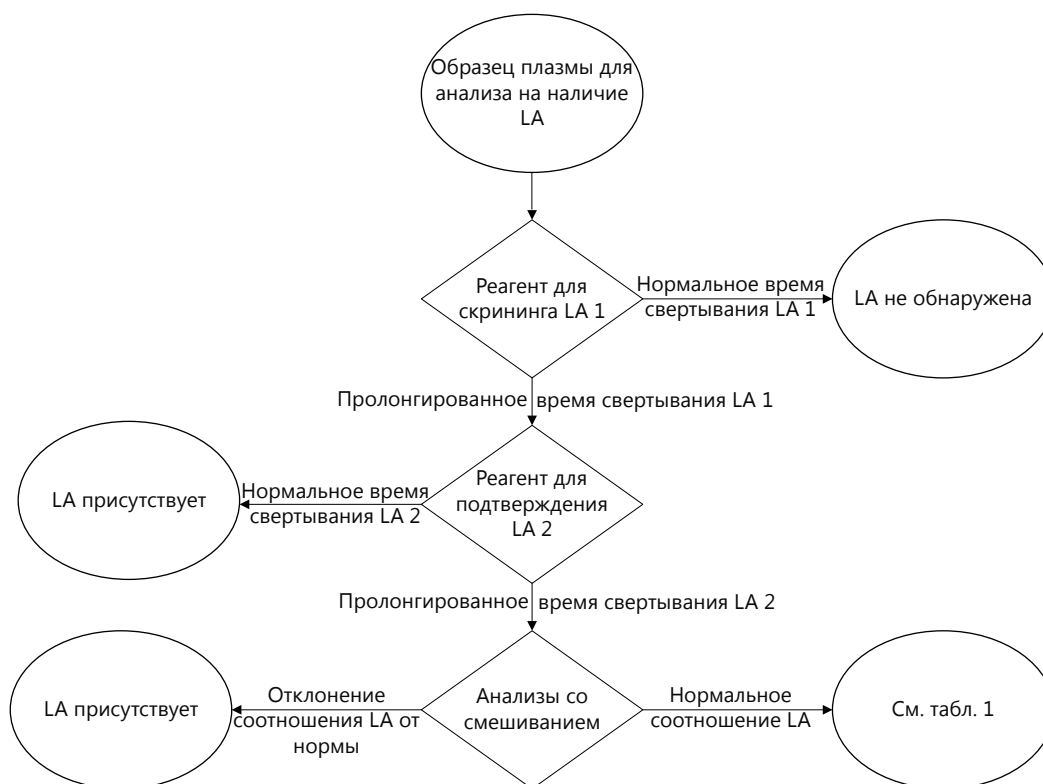


Рисунок 1

Анализ со смешиванием

Если результат сомнительный, для коррекции скрытых дефектов образца и уточнения наличия LA следует использовать анализы со смешиванием. В ходе этих анализов с помощью стандартной процедуры проведения анализа будет исследована смесь тестовой плазмы и нормальной плазмы в соотношении 50:50 (при проведении анализов со смешиванием нельзя использовать плазму Siemens Control Plasma N).

ТАБЛИЦА 1: Сочетание анализов со смешиванием и контрольных анализов

LA 1		LA 2		Диагноз
Плазма пациента	Смешанная пациента + нормальная	Плазма пациента	Смешанная пациента + нормальная	
Н	Н	Н	Н	LA не обнаружена
АНОМ	АНОМ	Н	Н	LA присутствует
АНОМ	Н	АНОМ	Н	Дефицит фактора/OAT
АНОМ	АНОМ	АНОМ	Н	LA + дефицит фактора
АНОМ	АНОМ	АНОМ	АНОМ	Другой ингибитор

Вычисление нормализованного отношения может быть полезно для корректировки различия комбинаций прибор/реагент. Нормализация использует среднее время свертывания нормальной плазмы с реагентом для скрининга LA 1 и реагентом для подтверждения LA 2 в лаборатории пользователя. Это может подчеркнуть различия между нормальными образцами и образцами с низкой положительной реакцией на LA.

Нормализованное отношение =

$$\frac{\text{реагент для скрининга LA 1 с плазмой пациента}}{\text{средний показатель реагента для скрининга LA 1 с нормальной плазмой}} \times \frac{\text{средний показатель реагента для подтверждения LA 2}}{\text{реагент для подтверждения LA 2 с плазмой пациента}}$$

Указанная на рис. 1 схема также может быть использована для интерпретации нормализованного отношения.

Ограничения

Образцы, содержащие сгустки и образцы пациентов с нарушениями гематокрита, следует удалить из исследования. Образцы с признаками желтухи и липемии, а также гемолизованные образцы следует проверять вручную, так как при использовании некоторых методов фотоэлектрические инструменты дают ложные результаты.

При проведении анализов со смешиванием не рекомендуется использовать коммерчески доступные нормальные контроли качества плазмы с неуточненными уровнями цитрата и тромбоцитов.

Для сравнительных исследований анализы с использованием реагента для скрининга LA 1 и реагента для подтверждения LA 2 следует проводить одновременно.

Необходимо провести по меньшей мере 2 скрининг-теста на основе различных принципов анализа. Кроме того, в анализе со смешиванием для подтверждения присутствия ингибиторов свертывания и контрольных анализов следует в обязательном порядке документировать зависимость от фосфолипидов¹⁰.

Дозы гепарина до 1 ЕД/мл не оказывают эффекта вследствие наличия нейтрализующего агента в реагенте для скрининга LA 1 и реагенте для подтверждения LA 2.

Результаты этого анализа всегда следует интерпретировать, принимая во внимание анамнез пациента, клиническую картину и другие объективные данные.

Ожидаемые значения

Диапазоны нормальных данных для реагента для скрининга LA 1 31 до 44 сек. и реагента для подтверждения LA 2 30 до 38 сек. были получены способом ручного наклона пробирок с образцами, собранными у 26 здоровых индивидуумов в возрасте от 18 до 55 лет. Отношение LA 1/LA 2 находилось в диапазоне 0, 8–1,2. Эти результаты следует использовать только в качестве ориентира.

Если отношение $\frac{\text{скрининг LA 1}}{\text{подтверждение LA 2}}$ более 2,0, LA присутствует в значительных количествах;

если отношение $\frac{\text{скрининг LA 1}}{\text{подтверждение LA 2}}$ между 1,5 и 2,0, LA присутствует в умеренных количествах;

если отношение $\frac{\text{скрининг LA 1}}{\text{подтверждение LA 2}}$ составляет от 1,2 до 1,5, LA присутствует в незначительных количествах,

Каждая лаборатория должна определить свои собственные нормы для ручного и автоматизированного методов во избежание разночтений при использовании различных наборов образцов и инструментов.

Рабочие характеристики

Исследования внутрिलाбораторной и межлабораторной прецизионности проводились с использованием двух методов: ручного с наклоном пробирок и автоматизированного. Коэффициент вариации данных исследований составил менее 3,5 % при анализе образцов нормальной плазмы и менее 5 % при анализе аномальных образцов.

Исследования специфичности проводились на известных образцах плазмы крови.

Положительное отношение реагента для скрининга LA 1 / реагента для подтверждения LA 2 более 1,2 было обнаружено в известных*:

Плазма LA —	90 % (26/29)
Гепаринизированная плазма —	12 % (1/8)
Плазма пациента с ОАТ —	0 % (0/7)
Плазма с дефицитом фактора —	0 % (0/5)
Нормальная плазма —	2 % (1/60)

* ВНИМАНИЕ! Идентификация «известных» LA с АЧТВ + анализы со смешиванием образцов с КВС

Источники

1. Feinstein DI. Lupus anticoagulant, thrombosis and fetal loss. *N. Eng.J.Med.* 1985, 313, 1348-1350.
2. Triplett DA, Brandt JT. Laboratory identification of the lupus anticoagulant. *Br.J. Haematol.* 1991, 73, 139-142.
3. Exner T, Triplett DA, Taberner D, Machin SJ. Guidelines for testing and revised criteria for lupus anticoagulants. *Thromb. Haemostas.* 1991, 65, 320-322.
4. Rauch J, Tannenbaum M, Janoff AS. Distinguishing plasma lupus anticoagulants from antifactor antibodies using hexagonal phase II phospholipids. *Thromb. Haemostas.* 1989, 62, 892-896.
5. Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: Anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. *Ann. Intern. Med.* 1990, 112, 682-698.
6. Thiagarajan P, Pengo V, Shapiro SS. The use of the dilute Russell's viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. *Blood* 1986, 68, 869-874.
7. Exner T, Papadopoulos G, Koutts J Use of a simplified dilute Russell's viper venom time (DRV-VT) confirms heterogeneity among "lupus anticoagulants". *Blood Coag. Fibrinol.* 1990, 1, 259-266.
8. Petri M., Rheinschmidt.M. et al. The frequency of lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus. *Ann. Int. Med.* 1987, 106, 524-531.
9. Galli M., Finazzi G, Bevers EM, Barbui T. Kaolin clotting time and dilute Russel's viper venom time distinguish between prothrombin dependent and beta-2-glycoprotein 1 dependent antiphospholipid antibodies. *Blood.* 1995, 86, 617-623.
10. Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I, Criteria for the Diagnosis of Lupus Anticoagulants: An Update. *Thromb. Haemostas.* 1995, 74 (4), 1185-90.

Определение символов

	Не использовать повторно		Срок годности
	Номер партии		Каталожный номер
	Внимание, обратитесь к сопроводительным документам		Производитель
	Уполномоченный представитель в Европе		Содержит достаточное количество реагентов для анализов
	Биологическая опасность		Медицинское устройство для диагностики <i>In Vitro</i>
	Температурные ограничения		См. инструкцию по пользованию
	Нестерильно		Символ CE
	Содержание		Объем восстановленного раствора
	Уровень		Беречь от солнечных лучей

© 2008 Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH.

Все права защищены.



Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH
Emil-von-Behring-Str. 76
35041 Marburg/Germany

Siemens Healthcare Headquarters
Siemens Healthcare GmbH
Henkestraße 127
91052 Erlangen/Германия
Phone: +49 9131 84-0
siemens.com/healthcare